Həyat elmləri və biotibb jurnalı, cild 74, №2, səh. 13-19 (2019)

Создание бактериальной коллекции на основе штаммов, изолированных из почв Азербайджана и их скрининг на наличие новых антибактериальных биомолекул

А.Г. Агаева

Институт молекулярной биологии и биотехнологий НАН Азербайджана, Иззат Набиев, 11, Баку AZ1122, Азербайджан; E-mail: aytanaghayeva@gmail.com;
Принято к печати: 20.12. 2019

Основной целью исследовательской работы, проведенной в период с 2014 по 2018 годы, было создание бактериальной коллекции, которая включает новые, ранее некультивируемые штаммы, изолированные из почв Азербайджана и их антибактериальный скрининг. 30 образцов почв были собраны из разных зон Азербайджана и отправлены в Фраунхоферский центр молекулярной биотехнологии (США) для бактериальной изоляции и скрининга. Из 30 образцов почв было выделено 578 штаммов и создана новая бактериальная коллекция. Все 578 изолированных бактерий были проанализированы на антибактериальную активность против двух грамположительных (*Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis*) и двух грамотрицательных (*Escherichia coli)* патогенных штаммов методом подавления роста. 62 изолята продуцировали соединение, обладающее антибактериальной активностью по меньшей мере против одного патогенного индикатор-организма. Из 62 изолят 14 показали активность в супернатанте.

Ключевые слова: *Антибактериальные агенты, антимикробная активность, изоляция бактерий, патогенные бактерии, грамположительные бактерии, грамотрицательные бактерии*

ВВЕДЕНИЕ

Микроорганизмы являются самой древней формой жизни на Земле, они существуют миллиарды лет и успешно адаптируются к постоянно меняющимся условиям окружающей среды (Zengler, 2009; Kumar et al., 2017). Разнообразие микроорганизмов так же велико, как оно неизвестно (Vitorino et al., 2018). Микроорганизмы играют важнейшую роль в круговороте веществ и в поддержании динамического равновесия в биосфере Земли. Кроме того, микроорганизмы продуцируют целый ряд полезных органических соединений - аминокислот, белков, антибиотиков, липидов, витаминов, ферментов, пигментов, нуклеиновых кислот, которые широко используются в разных областях промышленности и в медицине (Singh et al., 2017; Raveendran et al., 2018; Singh et al., 2016; Matassa et al., 2016). Предполагаются, что в настоящее время идентифицировано менее одного процента от огромного разнообразия микроорганизмов (Wade, 2002; Kellenberger, 2001). Все известные микробные биомолекулы, полезные для человека в качестве лекарств, биотоплива и т. д., были продуцированы только 1% идентифицированных видов микроорганизмов.

Начиная с 1928 года – с года открытия пенициллина (Jones et al., 2017) - и по сегодняшний день основным оружием для борьбы с патогенными микроорганизмами являются антибиотики. Однако, в последние годы растет число устойчивых к антибиотикам бактерий, антибиотики постепенно теряют свою эффективность и это становится серьезной проблемой для здоровья (Ventola, 2015; Prestinaci et al., 2015). Каждый год в США около 90 000 пациентов заражаются и умирают от устойчивых к лекарствам бактерий. Для инфекций, вызванных метициллин-резистентным *Staphylococcus aureus* (MRSA) и устойчивым ко многим лекарствам (MDR) *Acinetobacter baumannii*, для лечения доступно меньше ан-

тибиотиков, чем 10 лет назад (Okwu et al, 2019; Manchanda et al., 2010; van Duin et al., 2016). Для многих других инфекций выбор антибиотиков быстро уменьшается. Например, для патогенных микроорганизмов, несущих плазмиду с геном New Delhi metallo-beta-lactamase-1 (NDM-1), практически нет выбора для антибиотикотерапии, поскольку NDM-1 вызывает устойчивость почти ко всем антибиотикам, имеющимся на рынке и на стадии разработки (Raghunath, 2010; Fomda et al., 2014). Изначально ген NDM-1 был идентифицирован в *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae*, но он обладает способностью быстро переноситься между бактериями посредством горизонтального трансфера генов (Khan et al., 2017; Johnning et al., 2018).

С другой стороны, так как большинство используемых сегодня в клинике антибиотиков были выделены из живых организмов или представляют собой модифицированные соединения, структура которых получена из натуральных продуктов (Jones et al., 2017), крупные компании со всего мира вкладывают огромные деньги для открытия и идентификации новых антибиотиков.

Учитывая критическую важность разработки новых антибиотиков, основной идеей и общей концепцией данной работы является создание коллекции микроорганизмов, в состав которой входят новые, ранее некультивируемые штаммы бактерий и их антибактериальный скрининг. Для реализации поставленной цели, мы решили изолировать бактерии из микробиоты Азербайджана. В литературе очень мало информации об антимикробной активности бактерий, изолированных из богатых почв Азербайджана, и это сильно увеличивает наши шансы на обнаружение нового штамма бактерий с полезными свойствами.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили 30 образцов почв, собранные в течение 2014–2018 годов из разных зон Азербайджана. Образцы почв, с глубины 5-10 см, собирали в отдельные стерильные полипропиленовые пакеты с использованием шпателя, которую стерилизовали в 100 % этаноле и промывали стерильной дистиллированной водой между образцами. Все собранные образцы были отправлены во Фраунхоферский центр молекулярной биотехнологии (США) для дальнейшего анализа.

Изоляцию бактерий осуществляли по методу стандартного серийного разведения. Чтобы осадить частицы почвы, примерно 1 грамм каждого образца почвы суспендировали в стерильном однократном натрий-фосфатном буфере, тщательно перемешивали и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре. Через 2 часа, образцы были серийно разведены в соотношении 1:10 в стерильном однократном натрий-фосфатном буфере в диапазоне от 10^{-1} до 10^{-3}. Для изоляции бактерий, 100 мкл неразведенного и серийно (1/10, 1/100 и 1/1000) разведенных образцов почвенной суспензии высевали на чашки Петри с триптическим соевым агаром (TSA) и инкубировали в течение 1-3 дней при 32 °C. Чашки Петри рассматривали ежедневно. Все колонии с разной морфологией переносили на свежую питательную среду (TSA) и очищали. На основе изолированных бактерий была создана бактериальная коллекция, в которой колонии отличались друг от друга морфологическими характеристиками (форма колонии, рельеф, характер поверхности, прозрачность, цвет, хромогенез, размер, консистенция). Все колонии в коллекции считались неизвестными бактериями, и хранились в 15 % глицерине при -80 °C.

На следующей стадии все изолированные штаммы бактерий были подвергнуты скринингу на их антибактериальную активность против двух грамположительных (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*) и двух грамотрицательных *Escherichia coli* (эталонный (DC0) и мутант проницаемости наружной мембраны (DC2)) патогенных штаммов - индикаторов методом подавления роста, как описано Hockett с некоторыми модификациями. Скрининг проводили путем добавления суспензии культуры неизвестных изолятов на чашку Петри с агаром, конфлюирующим со штамм – индикаторами (Balouiri et al., 2016; Hockett et al., 2017). Чашки были инкубированы при 37 °C на 20 часов. Изоляты с антибактериальной активностью были идентифицированы по наличию зоны подавления роста вокруг того места, где была добавлена суспензия. Диапа-

зон антибактериальной активности, выраженной в миллиметрах, оценивали путем измерения прозрачной зоны от края тестируемой колонии до края роста индикатор-организма. Зону подавления роста меньше 1 мм характеризовали как слабую, больше 1 мм как сильную активность. После первичного тестирования, штаммы, которые продемонстрировали антибактериальную активность, по меньшей мере против одного индикатора, были отобраны для дальнейшего исследования. Все изоляты с антибактериальной активностью были подвергнуты скринингу на наличие ингибирующей активности в супернатанте, чтобы определить, секретирует ли бактерия активное антибактериальное соединение в супернатант клеточной культуры. Скрининг проводили методом подавления роста (Balouiri et al., 2016; Hockett et al., 2017). Изоляты инокулировали в питательную среду (триптический соевый бульон - TSB) и выращивали при 32°C и 180 об/мин. После 24-часовой инкубации супернатанты собирали, центрифугировали при 10000 g в течение 15 минут при 4°C и фильтровали через 0,22 μm PES-мембрану. Культура и супернатант изолятов были нанесены на чашки Петри с агаром, конфлюирующим со штамм - индикатором, против которого изолят был активен. Чашки инкубировали при 37°C и измеряли диаметр зоны подавления роста.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из 30 собранных образцов почвы было выделено 578 аэробных бактериальных культур, и создана бактериальная коллекция. После создания, все изоляты коллекции могут быть проверены на антимикробную активность, а также на наличие других ценных соединений. Наши первоначальные исследования были сосредоточены на антибактериальном скрининге против 4 патогенных индикаторных организмов с использованием метода подавления роста (Рис. 1).

После первоначального скрининга 62 изолята продемонстрировали антибактериальную активность по крайней мере против одного индикатор-организма. 35 из них обладали грамположительной, 13 – грамотрицательной и 14 как грамположительной, так и грамотрицательной активностями. Все 62 изолята были идентифицированы как «интересующие изолята» и отобраны для дальнейшей характеристики.

Дальнейшие эксперименты были сосредоточены на тестировании «интересующих изолят» на ингибирующую активность в супернатанте. Скрининг по-прежнему осуществлялся методом подавления роста штамма-индикатора, против которого изолят был активен (Рис. 2).

Из 62 проанализированных изолят 14 продемонстрировали активность в супернатанте и были идентифицированы как «наиболее перспективные изоляты».

Создание бактериальной коллекции с широким разнообразием видов имеет очень важное значение для выявления новых биомолекул с ценными фармацевтическими и промышленными свойствами. Наши шансы на обнаружение новых биомолекул сильно возрастают, если в состав созданной коллекции входят новые, ранее неизвестные штаммы микроорганизмов. Учитывая, что в литературе очень мало информации об антимикробной активности бактерий, изолированных из богатых почв Азербайджана, наши шансы на обнаружение нового штамма бактерий с полезными свойствами сильно возрастают.

В результате проведенных экспериментов создана бактериальная коллекция, состоящая из 578 микроорганизмов. В данной работе представлены результаты антибактериального скрининга. В дальнейшем, расширяя диапазон экпериментов, можно осуществить скрининг созданной коллекции на наличие в ней штаммов с противогрибковыми, противораковыми, противопаразитическими и др. активностями. По результатам антибактериального скрининга 14 изолят показали активность против тестируемого патогенного индикатор-организма. На этой стадии все 14 изолят рассматриваются как потенциальный продуцент новых биомолекул. Дальнейший анализ выбранных микроорганизмов будет включать их идентификацию путем секвенирования 16S rRNA гена, выделение/очистку секретируемых биоактивных соединений из бесклеточного культурального супернатанта, определение химической структуры биомолекулы и подтверждение антимикробной активности *in vivo*.

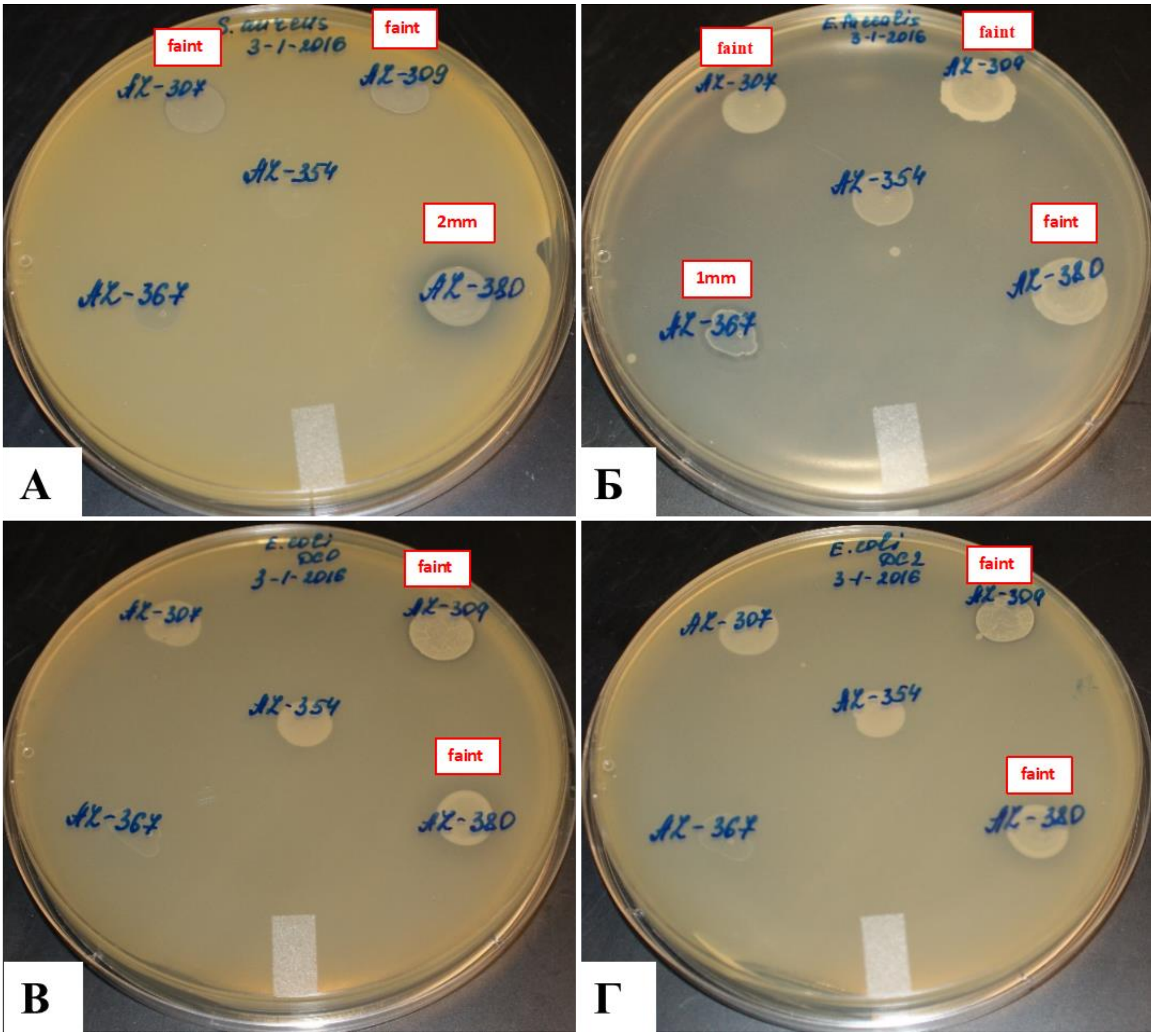


Рис. 1. ***Антибактериальный скрининг.*** А) Изоляты AZ-307, AZ-309 и AZ-380 показывают соответственно слабую, слабую и ~2 мм зону подавления роста против *S.aureus;* Б) Изоляты AZ-307, AZ-309 и AZ-380 показывают слабую, а AZ-367 – 1 мм активность против *E.faecalis*; В) Г) Изоляты AZ-309 и AZ-380 показывают слабую активность против *E.coli* DC0 и *E.coli* DC2.

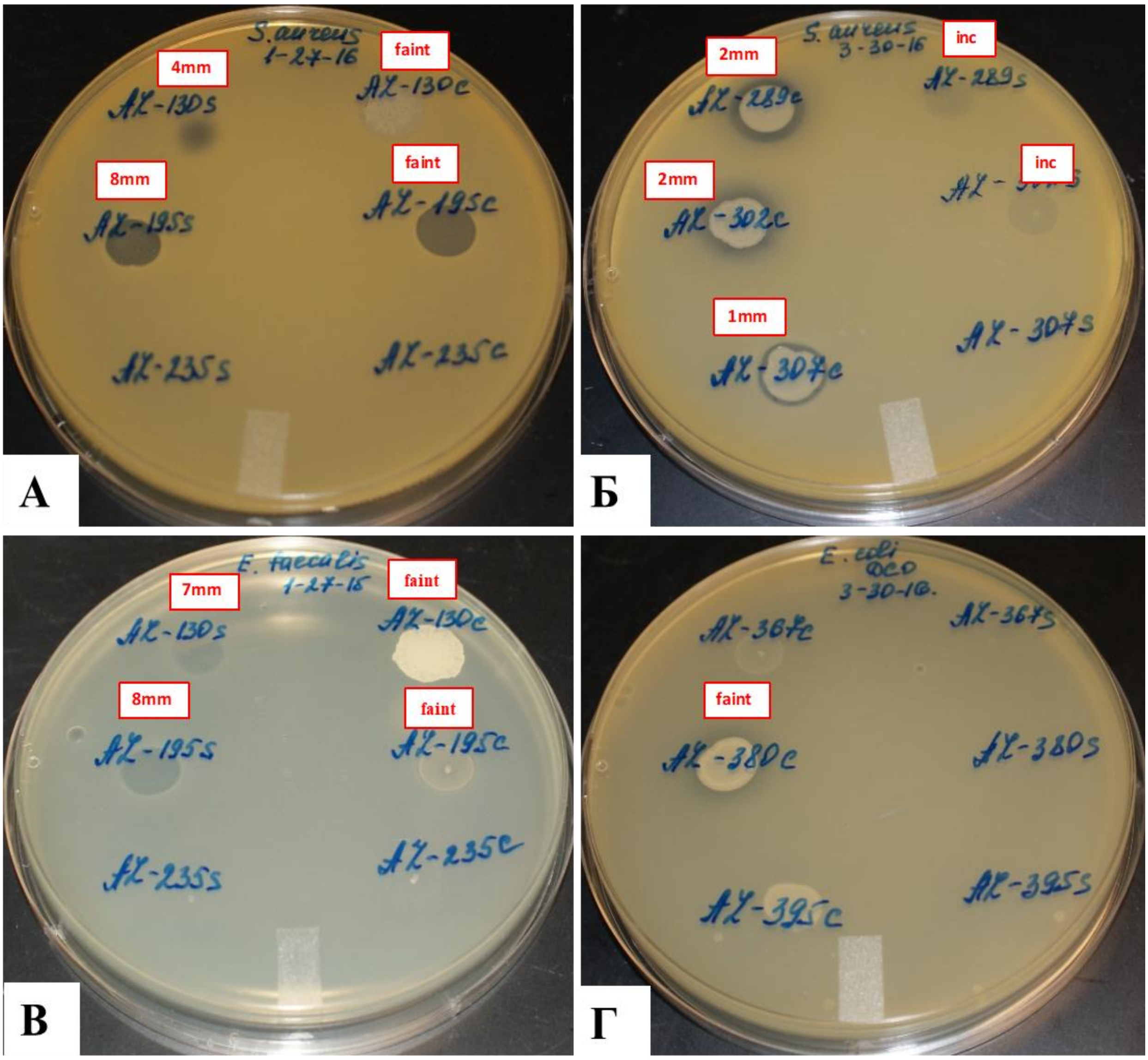


Рис. 2. ***Скрининг супернатанта.*** А) Супернатанты AZ-130 и AZ-195 соответственно показывают ~4 мм и ~8 мм зону подавления роста, в то время как, культура этих же самых изолят показали лишь слабую активность против *S.aureus*. Б) Супернатанты AZ-289 и AZ-302 показали слабую активность, в то время как, культура этих же самых изолят показали активность в 2 мм против *S.aureus;* AZ-307 показывает активность в 1 мм в культуре, но нет никакой активности в супернатанте против *S.aureus*. В) Супернатанты AZ-130 и AZ-195 соответственно показывают ~7 мм и ~8 мм зону подавления роста, в то время как, культура этих же самых изолят показали лишь слабую активность против *E.faecalis*. Г) AZ-380 показывает слабую активность в культуре против *E.coli*. Но в супернатанте нет никакой активности

Дальнейший анализ выбранных микроорганизмов будет включать их идентификацию путем секвенирования 16S rRNA гена, выделение/очистку секретируемых биоактивных соединений из бесклеточного культурального супернатанта, определение химической структуры биомолекулы и подтверждение антимикробной активности *in vivo*.

ПРИЗНАТЕЛЬНОСТЬ

Автор статьи выражает благодарность и глубокую признательность академику И.М.Гусейновой, профессору В.М.Юсибову (научно-исследовательский институт биологических наук Индианы, США), профессорам S.J.Streatfield и J.Karczewski (Фраунхоферский центр молекулярной биотехнологии, США), профессору S.Goldman (Evolva, Калифорния, США) и C.M.Morris (Hygiena/Qualicon Diagnostics LLC, Делавер, США) за советы и ценные замечания при работе над данной статьей.

ЛИТЕРАТУРА

Balouiri M., Sadiki M., Ibnsouda S.K. (2016) Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J. Pharm. Anal.*, **6(2):** 71-79.

Fomda B.A., Khan A., Zahoor D. (2014) NDM-1 (New Delhi metallo beta lactamase-1) producing Gram-negative bacilli: Emergence & clinical implications. *Indian J. Med. Res*., **140(5):** 672-678.

Hockett K.L., Baltrus D.A. (2017) Use of the soft-agar overlay technique to screen for bacterially produced inhibitory compounds. J. Vis. Exp., **119:** 55064.

Johnning A., Karami N., Hallbäck T.E., Müller Vilhelm., Nyberg L., Buongermino P.M., Stewart C., Ambjörnsson T., Westerlund F., Adlerberth I. and Kristiansson E. (2018) The resistomes of six carbapenem-resistant pathogens – a critical genotype–phenotype analysis. *Microb. Genom*., **4(11):** doi: 10.1099/mgen.0.000233.

Jones M.B., Nierman W.C., Shan Y., Frank B.C., Spoering A., Ling L., Peoples A., Zullo A., Lewis K., Nelson K.E. (2017) Reducing the bottleneck in discovery of novel antibiotics. *Microbial Ecology,* **73(3):** 658-667.

Kellenberger E. (2001) Exploring the unknown. The silent revolution of microbiology. *EMBO reports*, **2(1):** 5–7.

Khan A.U., Maryam L., Zarrilli R. (2017) Structure, genetics and worldwide spread of New Delhi Metallo-β-lactamase (NDM): a threat to public health. *BMC Microbiol*., **17:** 101.

Kumar A., Chordia N. (2017) Role of microbes in human health. *Applied Microbiology: Open Access*. **3:** 2.

Manchanda V., Sanchaita S., Singh N.P. (2010) Multidrug resistant acinetobacter. *J. Glob. Infect. Dis*., **2(3):** 291-304.

Matassa S., Boon N., Pikaar I., Verstraete W. (2016) Microbial protein: future sustainable food supply route with low environmental footprint. *Microb. Biotechnol*., **9(5):** 568–575.

Okwu M.U., Olley M., Akpoka A.O., Izevbuwa O.E. (2019) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and anti-MRSA activities of extracts of some medicinal plants: A brief review. *AIMS Microbiology*, **5(2):** 117–137.

Prestinaci F., Pezzotti P., Pantosti A. (2015) Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathog. Glob. Health*, **109(7):** 309–318.

Raghunath D. (2010) New metallo β-lactamase NDM-1. *Indian J. Med. Res*., **132(5):** 478–481.

Raveendran S., Parameswaran B., Ummalyma S.B., Abraham A., Mathew A.K., Madhavan A., Rebello S., Pandey A. (2018) Applications of microbial enzymes in food industry. *Food Technol. Biotechnol*., **56(1):** 16–30.

Singh R., Kumar M., Mittal A., Mehta P.K. (2016) Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech.*, **6(2):** 174.

Singh R., Kumar M., Mittal A., Mehta PK. (2017) Microbial metabolites in nutrition, healthcare and agriculture. *3 Biotech*., **7(1):** 15.

van Duin D., Paterson D.L. (2016) Multidrug resistant bacteria in the community: Trends and lessons learned. *Infect. Dis. Clin. North. Am*., **30(2):** 377–390.

Ventola C.L. (2015) The antibiotic resistance crisis. Part 1: Causes and threats. *Pharmacy and Therapeutics*, **40(4):** 277–283.

Vitorino L.C., Bessa L.A. (2018) Microbial diversity: The gap between the estimated and the known. *Diversity*, **10(2):** 46

Wade W. (2002) Unculturable bacteria - the uncharacterized organisms that cause oral infections. *J. R. Soc. Med.*, **95(2):** 81–83.

Zengler K. (2009) Central role of the cell in microbial ecology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **73(4):** 712–729.

Azərbaycan torpaqlarından ayrılmış ştamlar əsasında bakteriya kolleksiyasının yaradılması və onların yeni antibakterial biomolekulların mövcudluğuna görə skrininqi

A.Q. Ağayeva

AMEA Molekulyar Biologiya və Biotexnologiyalar İnstitutu, Bakı, Azərbaycan

2014-2018 illər ərzində aparılmış tədqiqat işinin əsas məqsədi tərkibinə Azərbaycan torpaqlarından ayrılmış yeni, əvvəllər becərilməmiş kulturalar daxil olan bakteriya kitabxanasının yaradılması və kulturaların antibakterial skrininqinin aparılması olmuşdur. Bu məqsədlə, 30 torpaq nümunələri Azərbaycanın müxtəlif bölgələrindən toplanmış və bakteriyaların ayrılması və skrininq edilməsi üçün ABŞ-ın Fraunhofer Molekulyar Biotexnologiya Mərkəzinə göndərilmişdir. Həmin torpaq nümunələrindən 578 bakteriya kulturası ayrılmış və yeni bakteriya kitabxanası yaradılmışdır. Kitabxanaya daxil olan 578 ştamların antibakterial fəallıqları 2 qram-müsbət (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*) və 2 qram-mənfi (*Escherichia coli*) patogen mikroorganizmlərə qarşı yoxlanılmışdır. Skrininq nəticəsində 62 ştam ən azı bir patogen orqanizmə qarşı antibakterial aktivlik göstərmişdir. Analiz edilmiş 62 bakteriya kulturasının 14-nün supernatantında antimikrob fəallıq müəyyən edilmişdir.

Açar sözlər: *Antibakterial agentlər, antimikrob fəallıq, bakteriyaların ayrılması, patogen bakteriyalar, qram-mənfi bakteriyalar, qram-müsbət bakteriyalar*

Creation of a bacterial library based on strains isolated from soil of Azerbaijan and their screening for the presence of new antibacterial biomolecules

A.G. Aghayeva

Institute of Molecular Biology and Biotechnologies, Azerbaijan National Academy of Sciences, Baku, Azerbaijan

The major goal of the research project carried out during the years 2014 - 2018 was to establish a library of microorganisms, including novel, previously uncultured bacterial species, isolated from soil of Azerbaijan, and their antibacterial screening. For this, 30 soil samples were collected from different zones of Azerbaijan and sent to the Fraunhofer USA Center for Molecular Biotechnology for bacterial isolation and screening. 578 bacterial strains were isolated from 30 soil samples and a new bacterial library was created. All 578 isolated strains were analyzed for antibacterial activity against two gram-positive (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*) and two gram-negative (*Escherichia coli*) pathogenic strains by growth inhibition assay. 62 isolates showed an antibacterial activity against at least one pathogenic indicator organism. After supernatant screening, 14 isolates showed an inhibitory activity in cell-free culture supernatant.

***Keywords*:** *Antibacterial agent, antimicrobial activity, bacterial isolation, pathogenic bacteria, gram-negative bacteria, gram-positive bacteria*